

29.9.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 21 OCT 2004

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年    9 月 3 0 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 3 4 1 4 1 9  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 3 4 1 4 1 9 ]

出      願      人            アンジェス M G 株式会社  
Applicant(s):

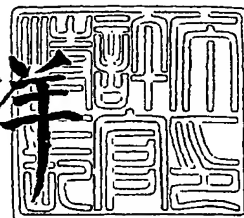
CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年    9 月 2 1 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P2003-03  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61K 48/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府吹田市藤白台 1-1-14-402  
    【氏名】 梶座 康夫  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府大阪市天王寺区四天王寺 1-5-45  
    【氏名】 富田 奈留也  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府大阪市東住吉区駒川 3-20-18-801  
    【氏名】 橋本 英雄  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府豊中市小路 2-111-1-605  
    【氏名】 吉川 秀樹  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区宮原 2-11-22-502  
    【氏名】 森下 竜一  
【特許出願人】  
    【識別番号】 500409323  
    【氏名又は名称】 アンジェス エムジー株式会社  
    【代表者】 山田 英  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 184182  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項 1】

一本鎖オリゴヌクレオチドであって、5' 端配列が中間部配列に逆向きの相補性を有し、3' 端配列も中間部配列に逆向きの相補性を有し、中間部の両端に分子内で相補的な結合を形成しない 3～10 の塩基配列からなるループ部を有するステイプル型オリゴヌクレオチド。

## 【請求項 2】

一本鎖オリゴヌクレオチドが 30～70 塩基長である、請求項 1 記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。

## 【請求項 3】

一本鎖オリゴヌクレオチドが 34～64 塩基長である、請求項 1 ないし 2 記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。

## 【請求項 4】

一本鎖オリゴヌクレオチドが 38～58 塩基長である、請求項 1 ないし 3 記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。

## 【請求項 5】

一本鎖オリゴヌクレオチドが 42～54 塩基長である、請求項 1 ないし 4 記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。

## 【請求項 6】

ループ部が、4～6 塩基長である請求項 1 ないし 5 記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。

## 【請求項 7】

一本鎖オリゴヌクレオチドが 42～54 塩基長であり、ループ部が 4～6 塩基長である、請求項 1 ないし 6 記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。

## 【請求項 8】

オリゴヌクレオチドが DNA または DNA 誘導体である、請求項 1 ないし 7 記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。

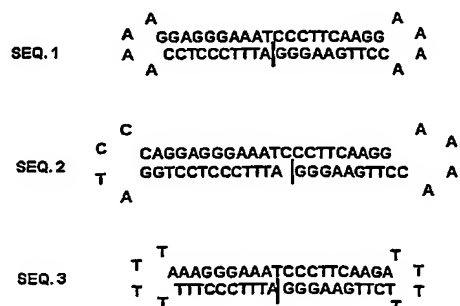
## 【請求項 9】

リン酸基がホスホロチオエート化されていないことを特徴とする、請求項 1 ないし 8 記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。

## 【請求項 10】

配列表の配列番号 1 ないし 3、または下記構造式で表されるオリゴデオキシヌクレオチドから選ばれた 1 種である、請求項 1 ないし 9 記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。

## 【化 1】



(式中、縦線は非結合部[5' 端および 3' 端]を意味する。)

## 【請求項 11】

請求項 1 ないし 10 記載のステイプル型オリゴヌクレオチドからなる医薬。

【請求項 12】

医薬が転写因子阻害剤、アンチセンスまたは siRNA である、請求項 1 ないし 11 記載の医薬。

【請求項 13】

転写因子阻害剤が拮抗的阻害剤である、請求項 12 記載の医薬。

【請求項 14】

転写因子が、NF- $\kappa$ B、STAT-1、STAT-2、STAT-3、STAT-4、STAT-5、STAT-6、GATA-3、AP-1、E2F、Ets および CRE から選ばれた 1 種である、請求項 12 または 13 記載の医薬。

【請求項 15】

医薬が、炎症、アレルギー性疾患、自己免疫疾患、中枢性疾患、虚血性疾患の再灌流障害、臓器移植又は臓器の手術後の予後の悪化または PTCA 後の再狭窄の予防・治療・改善剤である、請求項 12 ないし 14 記載の医薬。

【請求項 16】

炎症が、関節炎、皮膚炎、腎炎、肝炎、腎不全、膀胱炎、前立腺炎、尿道炎、潰瘍性大腸炎またはクローン病である、請求項 12 ないし 15 記載の医薬。

【請求項 17】

関節炎が、慢性関節リウマチまたは変形性関節症である、請求項 16 記載の医薬。

【請求項 18】

皮膚炎が、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、乾癬、皮膚潰瘍または褥瘡である、請求項 16 記載の医薬。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】ステイプル型オリゴヌクレオチドおよびそれからなる医薬

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、新規なステイプル型オリゴヌクレオチド、およびそれを有効成分とする医薬に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

従来オリゴヌクレオチドは、転写因子阻害剤、アンチセンス、siRNAなどとして広く利用されてきた。

## 【0003】

これらの中でも、例えば転写因子阻害剤として具体的には、遺伝子発現を調整する転写因子の活性を特異的に阻害するデコイ型核酸を挙げることができる。

## 【0004】

アンチセンスとして具体的には、目的の遺伝子と対合する配列を持ち、その遺伝子の発現を抑止する医薬を挙げることができる。

## 【0005】

siRNAとして具体的には、RNA干渉(RNA interference; RNAi)によって、標的遺伝子の発現阻害する医薬を挙げることができる。

## 【0006】

またこれらのオリゴヌクレオチドは、構造上、二本鎖を構成していることが特徴である。

## 【0007】

【非特許文献1】 Biochem Biophys Res Commun. 2003 Sep 5;308(4):689-97.

【非特許文献2】 Gene Ther. 2002 Dec;9(24):1682-92.

【非特許文献3】 Circ Res. 2002 Jun 28;90(12):1325-32.

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

本発明において解決しようとする問題点は、従来型のオリゴヌクレオチドは両端が開放(open)になっているために不安定であること、またホスホロチオエート化(S化)修飾により exonuclease等の分解酵素に対する安定性高めることも行われているが、ホスホロチオエートに起因する毒性が生じることである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明は、具体的には下記の医薬である。

- (1) 一本鎖オリゴヌクレオチドであって、5'端配列が中間部配列に逆向きの相補性を有し、3'端配列も中間部配列に逆向きの相補性を有し、中間部の両端に分子内で相補的な結合を形成しない3~10の塩基配列からなるループ部を有するステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (2) 一本鎖オリゴヌクレオチドが30~70塩基長である、(1)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (3) 一本鎖オリゴヌクレオチドが34~64塩基長である、(1)ないし(2)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (4) 一本鎖オリゴヌクレオチドが38~58塩基長である、(1)ないし(3)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (5) 一本鎖オリゴヌクレオチドが42~54塩基長である、(1)ないし(4)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (6) ループ部が、4~6塩基長である(1)ないし(5)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。

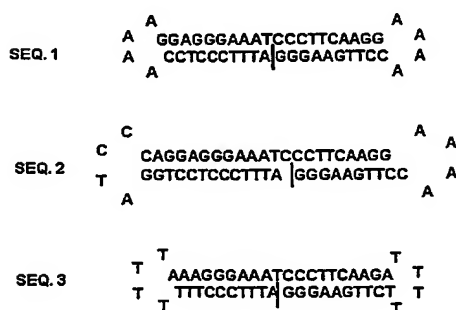
- (7) 一本鎖オリゴヌクレオチドが42～54塩基長であり、ループ部が4～6塩基長である、(1)ないし(6)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (8) オリゴヌクレオチドがDNAまたはDNA誘導体である、(1)ないし(7)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (9) リン酸基がホスホロチオエート化されていないことを特徴とする、(1)ないし(8)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (10) 配列表の配列番号1ないし3で表されるオリゴデオキシヌクレオチドから選ばれた1種である、(1)ないし(9)記載のステイプル型オリゴヌクレオチド。
- (11) (1)ないし(10)記載のステイプル型オリゴヌクレオチドからなる医薬。
- (12) 医薬が転写因子阻害剤、アンチセンスまたはsiRNAである、(1)ないし(11)記載の医薬。
- (13) 転写因子阻害剤が拮抗的阻害剤である、(12)記載の医薬。
- (14) 転写因子が、NF- $\kappa$ B、STAT-1、STAT-2、STAT-3、STAT-4、STAT-5、STAT-6、GATA-3、AP-1、E2F、EtsおよびCREから選ばれた1種である、(12)または(13)記載の医薬。
- (15) 医薬が、炎症、アレルギー性疾患、自己免疫疾患、中枢性疾患、虚血性疾患の再灌流障害、臓器移植又は臓器の手術後の予後の悪化またはPTCA後の再狭窄の予防・治療・改善剤である、(12)ないし(14)記載の医薬。
- (16) 炎症が、関節炎、皮膚炎、腎炎、肝炎、腎不全、膀胱炎、前立腺炎、尿道炎、潰瘍性大腸炎またはクローン病である、(12)ないし(15)記載の医薬。
- (17) 関節炎が、慢性関節リウマチまたは変形性関節症である、(16)記載の医薬。
- (18) 皮膚炎が、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、乾癬、皮膚潰瘍または褥瘡である、(16)記載の医薬。

## 【0010】

本発明におけるステイプル型オリゴヌクレオチドは一本鎖であって、5'端配列が中間部配列に逆向きの相補性を有し、3'端配列も中間部配列に逆向きの相補性を有し、中間部の両端に分子内で相補的な結合を形成しない3～10の塩基配列からなるループ部を有するステイプル型構造(押圧後のホッチキス針の形状)を有しており、具体的には例えば、下記化学式のような構造を有する。(式中、縦線は非結合部[5'端および3'端]を意味する。)

## 【0011】

## 【化2】



## 【0012】

またその鎖長は限定されないが、通常は30～70塩基長であり、好ましくは34～64塩基長であり、より好ましくは38～58塩基長であり、さらに好ましくは42～54塩基長である。

## 【0013】

次にループ部は3～10塩基長であり、好ましくは4～6塩基長である。

## 【0014】

さらに5'端および3'端の折り返し部配列(5'端または3'端からループ部までの相補性を有する配列)の鎖長も限定されないが、通常は4~20塩基長であり、好ましくは6~18塩基長であり、より好ましくは8~16塩基長である。

#### 【0015】

なお5'端および3'端の折り返し部配列の鎖長は、同一(対称形)であっても異なって(非対称形)いてもよい。

#### 【0016】

さらに本発明におけるオリゴヌクレオチドは限定されず、DNA、DNA誘導体、RNAあるいはRNA誘導体であってもよいが、DNAまたはDNA誘導体がより好ましい。

#### 【0017】

本発明におけるステイプル型オリゴヌクレオチドの具体例としては、例えば配列表の配列番号1ないし3で表されるオリゴデオキシヌクレオチドを挙げることができる。

#### 【0018】

なお本発明にかかるステイプル型オリゴヌクレオチドは、常法に従い、DNA合成機などで目的とする一本鎖配列を合成した後、溶媒中で加温することによって得ることができる。

#### 【0019】

また本発明におけるホスホロチオエートとは、リン酸基中の酸素原子が一部または全部、硫黄原子で置換された構造を意味する。

#### 【0020】

本発明におけるステイプル型オリゴヌクレオチドの医薬用途は限定されないが、具体的には、例えば転写因子阻害剤、アンチセンス、siRNA等であり、より具体的には、例えば炎症、自己免疫疾患、中枢性疾患、虚血性疾患の再灌流障害、臓器移植又は臓器の手術後の予後の悪化、PTCA後の再狭窄等の予防・治療・改善剤である。

#### 【0021】

ここで炎症としてさらに具体的には、例えば関節炎、皮膚炎、腎炎、肝炎、腎不全、膀胱炎、前立腺炎、尿道炎、潰瘍性大腸炎、クローン病等を挙げることができる。

#### 【0022】

次に関節炎としてさらに具体的には、例えば慢性関節リウマチ(RA)、変形性関節症(OA)等を挙げることができる。

#### 【0023】

続いて皮膚炎としてさらに具体的には、例えばアトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、乾癬、皮膚潰瘍、褥瘡等を挙げることができる。

#### 【0024】

本発明におけるステイプル型オリゴヌクレオチドの投与量あるいは投与経路も、疾患の種類・程度、症状、患者の年齢、性別、合併症、併用薬等によって異なり限定されないが、通常1回あたり10 $\mu$ g~10gを、好ましくは100 $\mu$ g~5gを、より好ましくは1mg~1gを、経皮、皮下、関節内、筋肉内、静脈内または経口投与する。

#### 【発明の効果】

#### 【0025】

本発明の実施により、従来型オリゴヌクレオチドが有する不安定性が改善され、投与量低減が可能となり、また安全性も向上させることができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0026】

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

#### 【実施例1】

#### 【0027】

#### ステイプル型オリゴヌクレオチドの抗炎症効果の検討

##### 1. サイトカインの定量

全体の流れを図1に示した。

#### 滑膜組織の処理

- (1) 手術時に採取した関節リウマチ患者の滑膜組織をhomogenizeした後、100mgずつ24well plateに播いた。(serum free medium 500  $\mu$ l)
- NF- $\kappa$ B デコイ、Scramble デコイ のtransfection (HVJenvelope法)
- (2) HVJ 1.1 $\times$ 10<sup>4</sup> HAU /1.1 ml BSSの状態です99mJ/cm<sup>2</sup>でUV処理した。
- (3) 1mlずつ1.5mlチューブに分注し、4℃15000rpm15min遠心処理した。
- (4) 200  $\mu$ gのデコイにBSSを添加し92  $\mu$ lとした。
- (5) 3%TritonX-100/TE Buffer溶液8  $\mu$ lを添加した。
- (6) 4℃15000rpm15min遠心後上清除去した。
- (7) BSS1mlを加えて混合後15000rpm15min遠心分離した。
- (8) 上清除去後200  $\mu$ lのPBSに懸濁した。
- (9) 15  $\mu$ Mになるようにデコイ-HVJenvelope混合体を滑膜組織に加えて37℃のCO<sub>2</sub> インキュベーターで30分インキュベートした。

#### 加えたデコイの配列

二重鎖NF- $\kappa$ B デコイ CCTTGAAGGGATTTCCTCC/GGAGGGAAATCCCTTCAAGG (二本鎖)

Scramble デコイ CATGTCGTCACCTGCGCTCAT/ATGAGCGCAGTGACGACATG (二本鎖)

ステイプル型オリゴヌクレオチド(i) ATTTCCCTCCAAAAGGAGGGAAATCCCTTCAAGGAAAACCTTGAA GGG (1ヶ所でligation)

ステイプル型オリゴヌクレオチド(ii) ATTTCCCTCCAAAAGGAGGGAAATCCCTTCAAGGAAAACCTTGAA AGGG (2ヶ所でligation)

【0028】

#### 2. LPS刺激

- (10) デコイ-HVJenvelope混合体を除去し10%FBS入りmedium500  $\mu$ lを加えて0.01  $\mu$ g/mlとなるようにLPSを添加した。

【0029】

#### 3. 培養液、滑膜組織回収IL-1 $\beta$ 測定

- (11) 24時間後に培養液及び滑膜組織を回収。滑膜組織にPBS500  $\mu$ lを加えてhomogenizerでhomogenize。5000rpm10min遠心後上清を採取した。IL-1 $\beta$ 測定まで-20℃保存した。
- (12) 培養上清、滑膜上清をIL-1 $\beta$  ELISA (ENDOGEN社) で測定した。

【0030】

#### 4. 結果

培養上清中のIL-1 $\beta$ 量 (pg/ml) (図2参照)

NT(LPS0)	90.8	NT(LPS0.01)	303.9
SC(LPS0)	49.6	SC(LPS0.01)	370.7
NF(LPS0)	102.1	NF(LPS0.01)	312.6
R1(LPS0)	14.6	R1(LPS0.01)	25.1
R2(LPS0)	22.9	R2(LPS0.01)	74.3

滑膜上清中のIL-1 $\beta$ 量 (pg/ml) (図3参照)

NT(LPS0)	17.5	NT(LPS0.01)	170.9
SC(LPS0)	7.2	SC(LPS0.01)	145.7
NF(LPS0)	10.5	NF(LPS0.01)	484.8
R1(LPS0)	13.5	R1(LPS0.01)	38.9
R2(LPS0)	15.6	R2(LPS0.01)	111.2

NT: 未処置群

SC: scramble デコイ投与群

NF: NF  $\kappa$ B デコイ投与群



R1: ステイブル型オリゴヌクレオチド (ligation1か所)

R2: ステイブル型オリゴヌクレオチド (ligation2か所)

ステイブル型オリゴヌクレオチド作用群において培養上清、滑膜上清中のIL-1 $\beta$ の産出を抑えていた。1ヶ所ligationしたステイブル型オリゴヌクレオチドの方が抑制効果は強かった。(二重鎖NF $\kappa$ B作用群で今回の実験では抑制効果が弱かった。)

【実施例 2】

【0031】

リボン型デコイの安定性試験 (図 4 参照)

目的: 関節液 (原液) 中でのデコイの耐性を比較

配列、実験条件:

S化二重鎖デコイと部分S化デコイとステイブル型オリゴヌクレオチド(S化なし)

一本鎖デコイ (ステイブル型オリゴヌクレオチドのligationする前の段階)、一本鎖デコイ (ステイブル型オリゴヌクレオチドのligationする前の段階、両断端のみS化したもの)

関節液 (原液) を0%, 50%, 100%加えて安定性を比較。

【0032】

結果: 関節液中でS化二重鎖デコイと部分S化デコイは安定、ステイブル型オリゴヌクレオチド(S化なし)はほぼ安定、一本鎖デコイは分解されていると思われる。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図 1】 サイトカイン定量の流れを示す図である。

【図 2】 LPS刺激24時間後の、培養上清中のIL-1 $\beta$ 量を示した図である。

【図 3】 LPS刺激24時間後の、滑膜上清中のIL-1 $\beta$ 量を示した図である。

【図 4】 リボン型デコイの安定性を示した図である。

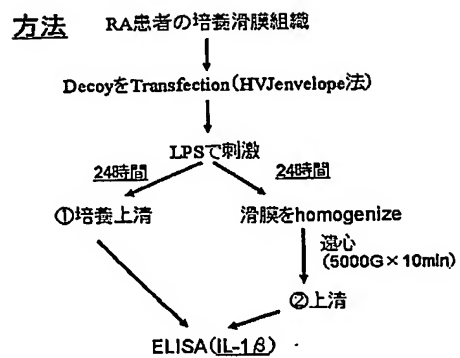
## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

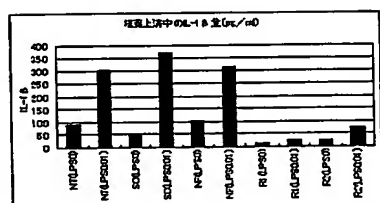
<110> AnGes MG, Inc.  
<160> NUMBER OF SEQ ID NOS: 3  
<200> SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
<210> SEQ ID NO 1  
<211> LENGTH: 48  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial SequenceSynthetic  
DNA  
<400> SEQUENCE: 1  
ATTTCCTCC AAAAGGAGGG AAATCCCTTC AAGGAAAACC TTGAAGGG  
20 40  
<200> SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
<210> SEQ ID NO 2  
<211> LENGTH: 53  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial SequenceSynthetic  
DNA  
<400> SEQUENCE: 2  
ATTTCCTCC TGGATCCCAG GAGGAAAATC CCTTCAAGGA AAACCTTGAA GGG  
20 40  
<200> SEQUENCE CHARACTERISTICS:  
<210> SEQ ID NO 3  
<211> LENGTH: 48  
<212> TYPE: DNA  
<213> ORGANISM: Artificial Sequence  
<220> FEATURE:  
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial SequenceSynthetic  
DNA  
<400> SEQUENCE: 3  
ATTTCCTTT TTTTAAAGGG AAATCCCTTC AAGATTTTTC TTGAAGGG  
20 40

【書類名】 図面

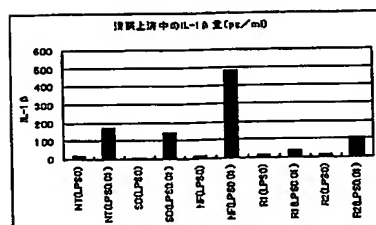
【図 1】



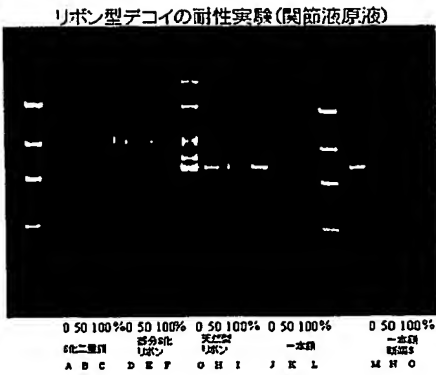
【図 2】



【図 3】



【図 4】



**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** 従来型のオリゴヌクレオチドは両端が開放になっているために不安定であること、ホスホロチオエート化(S化)修飾により分解酵素に対する安定性を高めることも行われているがホスホロチオエートに起因する毒性が生じることなどの問題点を改善したオリゴヌクレオチドと医薬を提供する。

**【解決手段】** ステイブル型オリゴヌクレオチドおよびそれを有効成分とする医薬。具体的には転写因子阻害剤、アンチセンスまたはsiRNAであり、より具体的には炎症、自己免疫疾患、中枢性疾患、虚血性疾患の再灌流障害、臓器移植又は臓器の手術後の予後の悪化またはPTCA後の再狭窄の予防・治療・改善剤であり、さらに具体的には関節炎、皮膚炎、腎炎、肝炎、腎不全、膀胱炎、前立腺炎、尿道炎、潰瘍性大腸炎またはクローン病、慢性関節リウマチまたは変形性関節症、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、乾癬、皮膚潰瘍または褥瘡の予防・治療・改善剤である。

**【選択図】** なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 3 4 1 4 1 9
受付番号	5 0 3 0 1 6 2 1 6 0 6
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 1 0 月 1 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成15年 9月30日

特願 2 0 0 3 - 3 4 1 4 1 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 0 4 0 9 3 2 3 ]

1. 変更年月日  
[変更理由]

2 0 0 1 年 1 2 月 6 日

名称変更

住所変更

住 所  
氏 名

大阪府豊中市新千里東町 1 丁目四番二号

アンジェス エムジー株式会社

2. 変更年月日  
[変更理由]

2 0 0 4 年 4 月 2 2 日

名称変更

住 所  
氏 名

大阪府豊中市新千里東町 1 丁目四番二号

アンジェスMG株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**